

О.В.ПославськаДЗ «Дніпропетровська
медична академія МОЗ
України»**Ключові слова:** нейро-
ендокринні пухлини,
імуногістохімія,
Cytokeratin 7.

Надійшла: 10.11.2015

Прийнята: 18.12.2015

УДК 616.33-006-008.9-092.18

**ОСОБЛИВОСТІ ІМУНОГІСТОХІМІЧНОЇ
ДІАГНОСТИКИ НЕЙРОЕНДОКРИННИХ
ПУХЛИН***Дослідження виконано в рамках науково-дослідної роботи «Патоморфологічна діагностика та прогноз перебігу новоутворень різних локалізацій з урахуванням маркерів біологічних властивостей» (номер державної реєстрації 0112U006965).*

Реферат. У роботі був проведений ретроспективний аналіз матеріалу 52 пацієнтів (30 жінок і 22 чоловіків) віком від 31 до 79 років з нейроендокринними пухлинами (НЕП) різних органів. Метою дослідження було визначення особливостей імунофенотипу НЕП відомих локалізацій для підвищення точності діагностики метастазів НЕП без первинного вогнища. В якості діагностичної панелі використовувались антитіла Cytokeratin Pan (клон AE1/AE3), Chromogranin A (клон LK2H10), Synaptophysin (клон SYP02), CD95 (клон AB3), Cytokeratin 7 (клон OV-TL 12/30), Vimentin (клон V9). Найбільш поширеним імунофенотипом НЕП досліджених локалізацій виявився Cytokeratin Pan+, Chromogranin A+ і/або Synaptophysin+, CD95+, Vimentin-. Експресія маркеру Cytokeratin 7 носила непостійний характер і не може використовуватися для надійного визначення точної первинної локалізації НЕП.

Morphologia. – 2015. – Т. 9, № 4. – С. 66-71.

© О.В.Пославська, 2015

✉ alexandra.poslavska@gmail.com**Poslavs'ka O.V. Features of the immunohistochemical diagnostics of neuroendocrine tumors.**

ABSTRACT. Background. The possibility of neuroendocrine tumor (NET) development from almost any organ causes problems in determination of a true primary site after detection of such metastases in lymph nodes or liver. It impels to consider the expression of immunohistochemical organ-specific markers such as cytokeratin (CK) along with the morphological characteristics. **Objective.** Determine the immunophenotype of neuroendocrine tumors of different localizations. **Methods.** Material from 52 patients (30 women and 22 men) aged 31 to 79 years (median 57 years) had been retrospectively analyzed during Jan 2012 – Oct 2014. Material included NET of different localization (9 cases in stomach, 7 in lung, 5 in colon, 3 in small intestine, 3 in larynx, 3 in mammary gland, 2 in pancreas, 1 in cervix and 1 in uterus body) or its metastasis from an unknown primary site (12 in lymph nodes, and 6 in the liver). CK Pan (clone AE1/AE3), Chromogranin A (CHR A) (clone LK2H10), Synaptophysin (SYN) (clone SYP02), CD95 (clone AB3), CK 7 (clone OV-TL 12/30), Vimentin (VIM) (clone V9) were used as a primary monoclonal antibodies. **Results.** 96% of cases have turned out to be CK Pan+, except 2 (3.8%) NET with a localization in lymph nodes. 84.6 % of tumors expressed SYN, except 2 (22.2%) in stomach, 1 (14.3%) in lung, 1 (100%) in uterus body, 3 (25%) in lymph node and 1 (16.7%) in liver metastasis. 82.7% gave a positive staining for CHR A, except for 3 (60%) in colon, 1 (33.3%) in small intestine, 1 (11,1%) in stomach , 3 (25 %) in lymph nodes metastases (both of which are NET with CK Pan-) and 1 (16.7%) of liver metastases. VIM+ were only 4 cases (both of which are NET, 1 (100%) of uterus body and 1 (16.7%) of liver metastasis). Positive cases of CK 7 expression were 6 (66.7%) in stomach NET (all carcinoids), 3 (42.9%) in lung, 1 (20%) in colon, 1 (33.3%) in larynx, 2 (16.7%) in lymph node and 2 (33.3%) in liver metastasis. **Conclusions.** The most common NET phenotype of these localizations is CK Pan+, CHR A+ and/or SYN+, CD95+, VIM-. Expression of CK 7 is intermittent and can not be used to reliably determine the primary site of NET.

Key words: NET, immunohistochemistry, CK 7.**Citation:**

Poslavs'ka OV. [Features of the immunohistochemical diagnostics of neuroendocrine tumors]. Morphologia. 2015;9(4):66-71. Ukrainian.

Вступ

Можливість розвитку нейроендокринної пухлини (НЕП) практично з будь-якого органу викликає складності у встановленні первинної локалізації при виявленні їх метастазів у лімфатичних вузлах або печінці. Ще в 1968 році британський патоморфолог Anthony Guy Everson Pearse знайшов в організмі людини дифузно розташо-

вану високоспеціалізовану систему клітин, що можуть шляхом декарбоксилювання перетворювати неактивні попередники в діючі біогенні аміни та пептидні гормони [1]. На сучасному етапі уявлення про нейроектодермальне походження всіх апудоцитів виявилось невірним. Таке походження має частина ендокринних клітин (апудоцити парагангліїв, гіпоталамуса, мозкової

речовини надниркових залоз, епіфізу). Інші, а їх більшість, розвиваються із загальних поліпотентних стоволових клітин: із ентодерми – апудоцити шлунково-кишкового тракту, підшлункової й щитоподібної залоз, легень; із ектодерми – апудоцити аденогіпофізу, шкіри і т. ін. [1, 2]. Зважаючи на схожість функції і кінцевого диференціювання «дифузної ендокринної системи», саме різність походження апудоцитів іноді дає можливість встановити первинну локалізацію такої злоякісної пухлини з віддаленими метастазами. І це викликає необхідність пошуку органоспецифічних маркерів для первинної діагностичної панелі, наприклад, цитокератинів (ЦК) [3, 4].

Цитокератини входять до складу перших двох класів проміжних філаментів, що разом із мікротрубочкам та мікрофіламентами складають цитоскелет практично всіх еукаріотичних клітин. Цитокератини відносять до фундаментальних маркерів епітеліального диференціювання, і карциноми більшим чином експресують набір ЦК, що мало відрізняється від спектра первинного джерела пухлини. Так, наприклад, ЦК №7 широким розповсюдженням набуває в перехідному епітелії, мезотелії, простому епітелії жовчовивідних та панкреатичних проток, легневих альвеол, ендометрію, збиральних трубочок нирок, а помі-

рну кількість – в ендокринних залозах, нейроендокринних клітинах, що може бути використано для діагностики НЕП [1, 5, 6].

Мета дослідження: визначення особливостей імунофенотипу нейроендокринних пухлин відомих локалізацій для підвищення точності подальшої діагностики метастазів нейроендокринних неоплазій з високим злоякісним потенціалом без виявленого первинного вогнища.

Матеріали та методи

В роботі проведений ретроспективний аналіз матеріалу 52 пацієнтів (30 жінок і 22 чоловіків) віком від 31 до 79 років (медіана 57 років), отриманий протягом січня 2012 - жовтня 2014 року, з діагнозом НЕП різних локалізацій або метастазів НЕП без відомого первинного вогнища. Діагноз виставлявся двома досвідченими патоморфологами незалежно один від одного на підставі результатів імуногістохімічного (ІГХ) дослідження, проведеного в морфологічному відділі діагностичного центру ООО «Аптеки медичної академії», м. Дніпропетровськ. Градації стадіювання, ступень диференціації та показники прогнозу НЕП виставлялися згідно рекомендаціям ВООЗ [1, 7]. Розподіл матеріалу за клініко-морфологічними характеристиками занесено в таблицю 1.

Таблиця 1
Характеристика клініко-морфологічних даних пацієнтів

Характеристика	Кількість випадків (n=52)	Відсотки (%)
Стать		
Чоловіки	22	42,3%
Жінки	30	57,7%
Локалізація		
<i>1. Гастроінтестинальна</i>	<i>17</i>	<i>32,7%</i>
Шлунок	9	17,3%
Товста кишка	5	9,6%
Тонка кишка	3	5,8%
<i>2. Інша</i>	<i>17</i>	<i>32,7%</i>
Легені	7	13,5%
Гортань	3	5,8%
Молочна залоза	3	5,8%
Підшлункова залоза	2	3,8%
Шийка матки	1	1,9%
Тіло матки	1	1,9%
<i>3. Метастаз без первинної локалізації</i>	<i>18</i>	<i>34,6%</i>
Лімфатичні вузли	12	23,1%
Печінка	6	11,5%

Світлова мікроскопія проводилась з використанням мікроскопу “Leika DLM-E” (США), об’єктивами $\times 20$, $\times 40$, $\times 100$. Гістологічні зрізи товщиною 4-6 мкм наносили на адгезивні предметні скельця SuperFrost Plus, після депарафінізації та регідратації зрізів проводили температурне демаскування антигенів – heat induction of epitope retrieval (зрізи були розміщені в цитратному буфері з рН 6.0 і підігрівалися в автоклаві

при температурі $+121^{\circ}\text{C}$ 8 хвилин) та пригнічували активність ендокриної пероксидази 3% розчином перекису водню протягом 20 хвилин. Далі проводили інкубацію зрізів з первинними антитілами у вологих камерах при температурі $23-25^{\circ}\text{C}$ на протязі 30 хвилин. В якості первинних використовувалися моноклональні антитіла до Cytokeratin Pan (проміжні філаменти епітеліальної диференціації), Chromogranin A (маркер спе-

цифічних ендокринних гранул), Synaptophysin (маркер малих везикул із нейротрансмітерами), CD95 (маркер молекул нейрорадгезії), Cytokeratin 7, Vimentin (проміжний філамент мезенхімальної диференціації) (TermoScientific, США) (табл. 2). Титр антитіл підбирався згідно рекомендацій виробника з використанням у якості розчинника

спеціального розчину Antibody Diluent (TermoScientific, США). Для ідентифікації реакцій використовували систему візуалізації Quanto (TermoScientific, США), з нанесенням в якості хромогену 3-діамінобензидин тетраклориду (TermoScientific, США).

Таблиця 2

Панель первинних антитіл

Антитіло	Клон	Титр	Виробник
Cytokeratin Pan	клон AE1 / AE3	1:200	TermoScientific
Chromogranin A	клон LK2H10	1:100	TermoScientific
Synaptophysin	клон SYP02	1:300	TermoScientific
Cytokeratin 7	клон OV-TL 12/30	1:100	TermoScientific
Vimentin	клон V9	1:250	TermoScientific
CD95	клон AB3	1:200	TermoScientific

При оцінюванні цитоплазматичних або ядерно-цитоплазматичних реакцій з вищезазначеними маркерами рівень інтенсивності забарвлення визначався в 10 полях зору при збільшенні ($\times 400$) за 4 градаціями: (0) негативна реакція, (+) – слабка, або в поодиноких клітинах, (++) – помірна, або в частині клітин пухлини, (++++) – сильна, за рекомендаціями дослідників [2-6].

Дані вищенаведених морфометричних та імуногістохімічних досліджень, зазначали статистичної обробки в програмі SPSS Statistica 17.0.

Результати дослідження та їх обговорення

Для 96% випадків НЕП експресія загального маркера епітеліальної диференціації Cytokeratin Pan виявилася позитивною (крім 2 метастазів в лімфатичних вузлах без первинного вогнища НЕП), для порівняння маркер пухлин «мезенхімального походження» Vimentin був позитивним лише в 4 випадках (2 з яких були негативним і на Cytokeratin Pan із лімфатичних вузлів, 1 (100%) з тіла матки та 1 (16,7%) з метастазів у печінці).

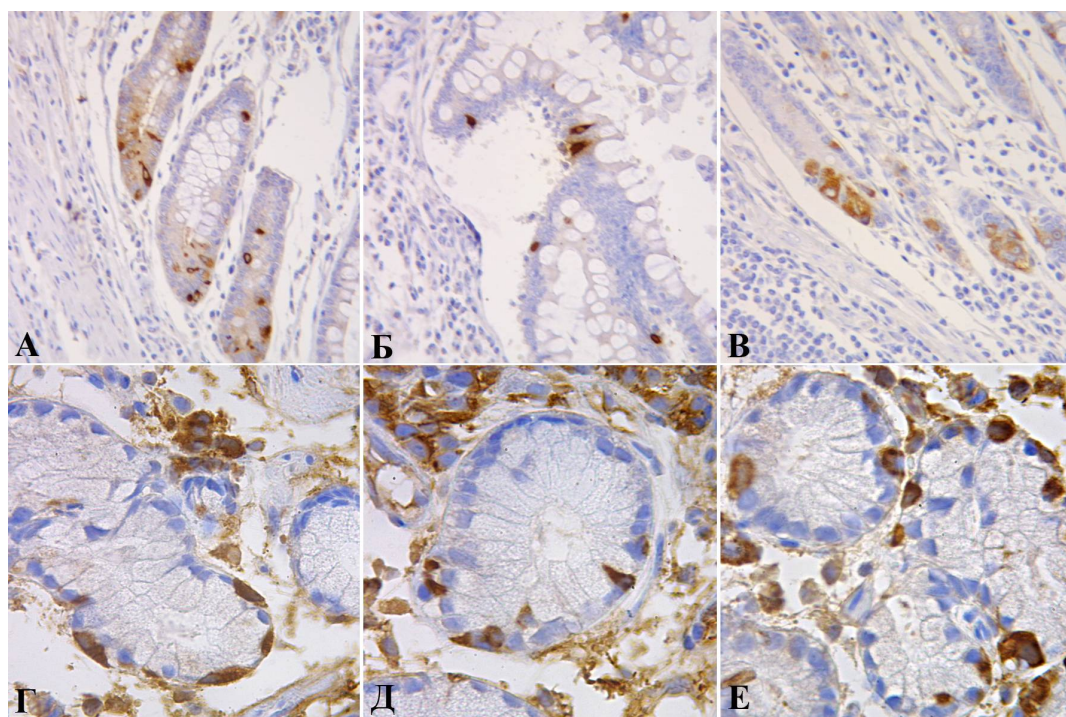


Рис. 1. Нейроендокринні клітини гастроінтестинального тракту (внутрішній контроль), інтенсивна цитоплазматична реакція з маркером Synaptophysin, ІГХ, додаткове забарвлення гематоксиліном Майєра. А. Чисельні серед епітеліальних клітин залоз ($\times 200$). Б. В слизовій оболонці з видовженими відростками, що виходять в просвіт кишки ($\times 200$). В. Поліморфні з секреторними гранулами ($\times 200$). Г, Д, Е – пухлинні клітини нейроендокринного походження навколо залоз з позитивним внутрішнім контролем ($\times 1000$).

84,6% пухлин експресували Synaptophysin більшим чином на високому (+++) та помірному (++) рівнях, за винятком 8 спостережень (2 (22,2%) – з шлунку, 1 (14,3%) – з легенів, 1 (100%) – з тіла матки, 3 (25%) метастазів з лімфатичних вузлів і 1 (16,7%) – з печінки. Треба відмітити, що для точної інтерпретації результатів ІГХ в пухлині реакції завжди співставляли із внутрішнім контролем (позитивними апудоцитами здорової тканини (рис. 1)). Трохи менше, 82,7% НЕП, дали позитивне фарбування на Chromogranin A, за винятком 9 спостережень (3

(60%) – з товстої кишки, 1 (33,3%) – з тонкої кишки, 1 (11,1%) – випадку шлунку, 3 метастазів (25%) – з лімфатичних вузлів (2 з яких були негативним і на Cytokeratin Pan) і 1 (16,7%) метастаз у печінці). Інтенсивність фарбування Chromogranin A досить сильно варіювала від інтенсивно всіх забарвлених клітин до поодиноких цитоплазматичних гранул в частині клітин НЕП, але 7 Synaptophysin негативних випадків були позитивними на Chromogranin A, що доводить його діагностичну значущість в парі з Synaptophysin.

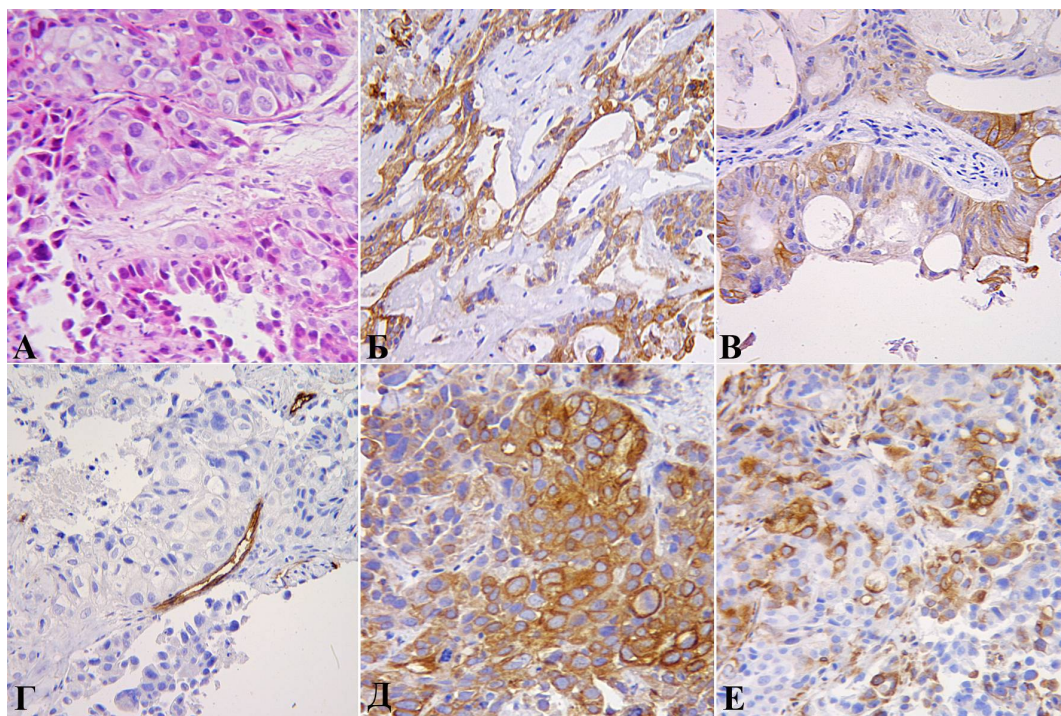


Рис. 2. А. Нейроендокринний рак гастроінтестинального тракту, забарвлення гематоксином-еозином, $\times 400$. Б. Цитоплазматична реакція пухлинних клітин з Cytokeratin Pan, ІГХ, додаткове забарвлення гематоксином Майєра, $\times 400$. В. Цитоплазматична реакція частини клітин з маркером Cytokeratin 7, ІГХ, додаткове забарвлення гематоксином Майєра, $\times 400$. Г. Негативна реакція пухлинних клітин із Vimentin, що спростовує їх мезенхімальне походження, ІГХ, додаткове забарвлення гематоксином Майєра, $\times 400$. Д. Інтенсивна цитоплазматична реакція з Synaptophysin більшості клітин, ІГХ, додаткове забарвлення гематоксином Майєра, $\times 400$. Е. Інтенсивна цитоплазматична реакція з Chromogranin A частини клітин, ІГХ, додаткове забарвлення гематоксином Майєра, $\times 400$.

Молекула нейроадгезії CD95 експресувалась в 43 із 54 випадків НЕП (79,6%) у вигляді цитоплазматичних депозитів різної інтенсивності, але не показала жодної закономірності із локалізацією пухлини або ІГХ реакціями попередніх маркерів.

Позитивні на Cytokeratin 7 випадки можна поділити також на три групи:

- гастроінтестинальна локалізація (n=7): 6 (66,7%) з шлунку (всі карциноїди, тобто високодиференційовані НЕП із низьким потенціалом злоякісності), 1 (20%) з товстої кишки (рис. 2),
- інші локалізації (n=4): 3 (42,9%) з легенів, 1 (33,3%) гортані,

- метастази без первинного джерела: 2 (16,7%) з лімфатичних вузлів і 2 (33,3%) метастазів печінки (рис. 3).

Експресія Cytokeratin 7 не показала залежності від експресії інших досліджуваних маркерів, носила вірогідний характер і тільки орієнтовно демонструвала локалізацію НЕП (шлунок, легені). Таким чином, Cytokeratin 7 може застосовуватися для первинної панелі в діагностиці НЕП без первинного джерела тільки вкупі із іншими цитокератинами (наприклад Cytokeratin 20) для виключення помилкової інтерпретації результатів.

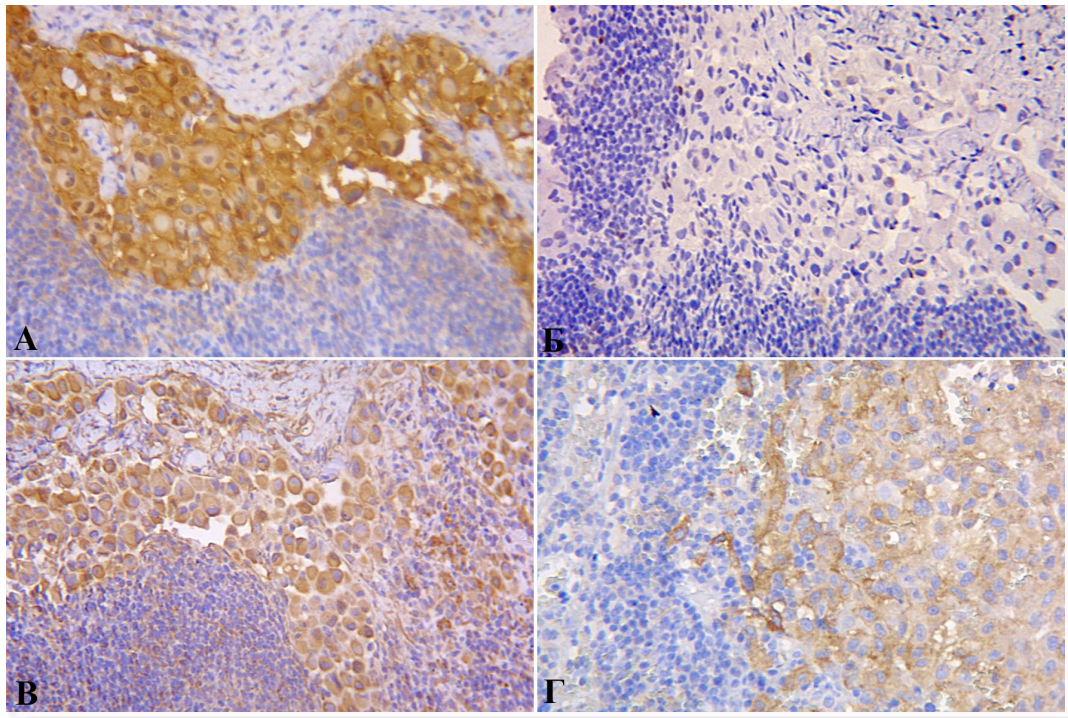


Рис. 3. А. Метастаз нейроендокринного раку в аксиллярний лімфатичний вузол без первинного джерела, інтенсивна цитоплазматична реакція пухлинних клітин з Synaptophysin, ІГХ, додаткове забарвлення гематоксином Майєра, $\times 400$. Б. Негативна реакція пухлинних клітин із Vimentin, ІГХ, додаткове забарвлення гематоксином Майєра, $\times 400$. В. Помірна цитоплазматична реакція з Chromogranin A, ІГХ, додаткове забарвлення гематоксином Майєра, $\times 400$. Г. Змішана мембранно-цитоплазматична реакція частини клітин з маркером Cytokeratin 7, ІГХ, додаткове забарвлення гематоксином Майєра, $\times 400$.

Висновки

1. Найбільш поширеним імунофенотипом нейроендокринних пухлин досліджених локалізацій виявився Cytokeratin Pan+, Vimentin-, Chromogranin A+ і/або Synaptophysin+, CD95+.

2. Експресія маркеру Cytokeratin 7 носила непостійний характер і не може використовуватися для надійного визначення первинної локалі-

зації нейроендокринних пухлин.

Перспективи подальших розробок

Подальший пошук органоспецифічних імуногістохімічних маркерів для точної верифікації первинного вогнища метастазів нейроендокринних карцином є перспективним напрямком досліджень вищезазначених пухлин.

Літературні джерела References

1. Petrov SV, Reikhlin NT editors: [Manual on immunohistochemical diagnostics of human tumors]. 4th ed. Kazan: Title; 2012. 623 p. Russian.
2. Fletcher CDM, author. Diagnostic histopathology of tumors. 4th ed. PA: Elsevier; 2013. 1148 p.
3. Wong HH, Chu P, Wong Hannah H. Immunohistochemical features of the gastrointestinal tract tumors. J Gastrointest Oncol. 2012; 3(3): 262-84.
4. Namikawa T, Oki T, Kitagawa H, Okabayashi T, Kobayashi M, Hanazaki K. Neuroendocrine carcinoma of the stomach: clinicopathological and immunohistochemical evaluation. Med Mol Morphol. 2013 Mar;46(1):34-40. doi: 10.1007/s00795-012-0006-8.
5. Ishida M, Sekine S, Fukagawa T, Ohashi M, Morita S, Taniguchi H, Katai H, Tsuda H, Kushima R. Neuroendocrine carcinoma of the stomach: morphologic and immunohistochemical characteristics and prognosis. Am J Surg Pathol. 2013 Jul;37(7):949-59. doi: 10.1097/PAS.0b013e31828ff59d.
6. Wachter DL, Hartmann A, Beckmann MW, Fasching PA, Hein A, Bayer CM, Agaimy A. Expression of neuroendocrine markers in different molecular subtypes of breast carcinoma. Biomed Res Int 2014 19;2014:408459.
7. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND, authors. WHO classification of tumours of the digestive system. 4th ed. Lyon: IARC Press; 2010. 417 p.

Пославская А.В. Особенности иммуногистохимической диагностики нейроэндокринных опухолей.

Реферат. В работе был проведен ретроспективный анализ материала 52 пациентов (30 женщин и 22 мужчин) в возрасте от 31 до 79 лет с нейроэндокринными опухолями (НЭО) различных органов. Целью исследования было определение особенностей иммунофенотипов НЭО известных локализаций для повышения точности диагностики метастазов НЭО без первичного очага. В качестве диагностической панели были использованы антитела Cytokeratin Pan (клон AE1/ AE3), Chromogranin A (клон LK2H10), Synaptophysin (клон SYP02), CD95 (клон AB3), Cytokeratin 7 (клон OV-TL 12/30), Vimentin (клон V9). Наиболее распространенным иммунофенотипом НЭО исследованных локализаций оказался Cytokeratin Pan+ , Chromogranin A + и/или Synaptophysin+, CD95+, Vimentin-. Экспрессия маркера Cytokeratin 7 носила непостоянный характер и не может использоваться для точного определения первичной локализации НЭО ($p > 0,05$).

Ключевые слова. Нейроэндокринные опухоли, иммуногистохимия, цитокератин 7.